

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-027023

(43)Date of publication of application : 04.02.1994

(51)Int.Cl.

G01N 21/64

G01N 21/76

(21)Application number : 04-203040

(71)Applicant : TOTO LTD

(22)Date of filing : 07.07.1992

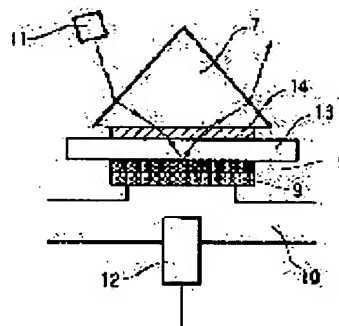
(72)Inventor : OSADA TAIJI

(54) OPTICAL BIOSENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an optical sensor for obtaining noiseless measurement by isolating exciting light perfectly from fluorescent light or the like derived from the exciting light.

CONSTITUTION: A thin metal film 8, i.e., a platinum film, is formed by 5nm thick through sputtering on a transparent glass substrate 13 having refractive index $nd=1.523$ and electrolytic polymerization is carried out with the platinum film as working electrode. A saturated calomel electrode is employed as a reference electrode and aqueous solution containing 200mg/dl of glycooxidase, 0.1M of pyrrole, 1M of $[Ru(phen)_3]Cl_2$, and LM of KCl is subjected to electrolysis with current conduction of 25C/cm² under condition of 0.8V vs SCE thus forming thin film of 0.1 μ m thick on an area of 2cm \times 3cm. The transparent substrate 13 is then set and irradiated with light from an exciting light generator 11, i.e., a halogen lamp, at an incident angle of about 75°.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-27023

(43)公開日 平成6年(1994)2月4日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 21/84	Z	9115-2 J		
21/76		7906-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数2(全 5 頁)

(21)出願番号 特開平4-203040

(22)出願日 平成4年(1992)7月7日

(71)出願人 000010087

東陶機器株式会社

福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号

(72)発明者 長田 泰二

福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社内

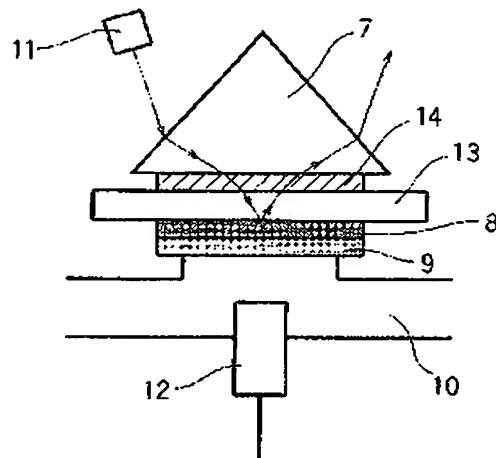
(74)代理人 弁理士 下田 容一郎 (外2名)

(54)【発明の名称】 光バイオセンサー

(57)【要約】

【目的】 励起光と、この励起光により発生する蛍光等との分離を完全に行い、ノイズのない測定結果を得ることのできる光センサーを提供する、

【構成】 屈折率 $n_d=1.523$ の透明ガラス基板13上にスパッタ法により金属薄膜8として白金膜を5nmの膜厚で形成し、これを作用極として電解重合を行った。参照電極に飽和カロメル電極を用い、0.8V vs SCEの条件で、グルコースオキシダーゼ 200mg/dl、ピロール 0.1M、 $[Ru(phen)_3]Cl_2 \cdot 1H_2O$ 及びKCl 1Mを含有する水溶液を、通電量 $25C/cm^2$ で電解し、 $2cm \times 3cm$ の面積に膜厚 $0.1 \mu m$ の薄膜を形成した。この透明基板13を図2のように配置し、励起光発生器11としてハロゲンランプを用い、入射角約75度で光照射を行った。



(2)

特開平6-27023

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 透明基材上に、金属薄膜、及び分子認識物質の作用によって発光強度が変化する発光物質を含有する分子認識機能膜がこの順に形成され、前記透明基材側に励起光発生器が配置され、前記分子認識機能膜側に試料溶液の流路を隔てて光検出器が配置されていることを特徴とする光バイオセンサー。

【請求項2】 前記分子認識機能膜は、電気重合法によって前記金属薄膜上に形成されているを特徴とする請求項1に記載の光バイオセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は発光物質の発光強度変化により、特定物質の濃度を検出する光学的バイオセンサーに関し、例えば生体液中の特定物質量を測定する臨床化学分析に有用である。

【0002】

【従来の技術】 生体は無機物や有機物を高い選択性で認識する能力を有している。その高い選択性を有する機能性分子、或いは細胞、組織を始め生体そのものを物質選択機能部位として、試料溶液中の検体を迅速に簡単に検出するデバイスがバイオセンサーである。

【0003】 上記バイオセンサーの機能は、特定の検体を選択的に認識して反応させる部分と、この反応による検体の導伝性、発熱、発光等の変化を捉らえて信号に変換する部分に分割して考える事ができる。検体を認識してこれと反応する生体高分子としては、酵素、抗体、受容体等の蛋白質などが知られており、これらは天然高分子や合成高分子から成る膜中や、ラングミュアブロジェット(LB)膜等の中に分散・固定化して用いられる。一方、反応を捉らえて信号に変換する部分には、一般的に酸素電極、過酸化水素電極、イオン電極、ガス電極などの電極が用いられている。また最近では光を利用したセンサー等が数多く提案されてきている。

【0004】 一方、光学的測定法は上記の電極を用いる電気化学的測定法に比べて有利であり、(1)近年の技術革新により微量の光を極めて高感度に検出することが可能になったこと、(2)測定に際して電気的、磁気的ノイズが発生しにくいこと等の特徴がある。中でも例えば特開平3-12849号公報に見られるように蛍光、燐光(化学発光、生物発光等)の検出が広く試みられている。また励起光の照射や蛍光、燐光を検出する光伝導体としては、(1)検体量が減少して済むこと、(2)装置の小型化が可能になること、等から光ファイバーが多く用いられている。

【0005】 光ファイバーを用いた光センサーとしては図5に示したような構成が用いられる。即ち同図(a)は1本の光ファイバー1の先端に分子認識機能膜2を設けた構造であって、励起光3の照射と蛍光4の発光検出を1本のファイバーで行う方法である。また(b)はY型の

2

光ファイバー1の先端に分子認識機能膜2を設けた構造であって、一方のファイバーで励起光3を照射し、もう一方のファイバーで蛍光4を検知する方法である。また(c)は、励起光の分子認識機能膜への照射を他の手段で行い、蛍光4のみを光ファイバー1の束で検知器5へ伝導する方法である。さらに(d)は1本の光ファイバーのコア部6の外壁に分子認識機能膜2を設け、コア部6内に照射された光3の透過光量の変化やファイバー外への発光を検知器5で検出する方法である。励起光と検出光との分離は多種のカットフィルターを組合わせて行われる。

【0006】 また、前記分子認識機能膜を作成する際の酵素等の固定化は、高分子担体への吸着、架橋、共有結合、包括固定等の方法が行われてきた(「固定化生体触媒」千畑善 講談社サイエンス)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 上述のカットフィルターによる方法では、照射する励起光と分子認識機能膜から発生する蛍光、燐光等の検出光との分離は手間も掛かり、しかも一般的にカットフィルターでは励起光よりも波長の長い光しか検出できないといった難点があった。また上述の酵素固定化方法では、膜を均一にしかも薄く成膜することが困難であり、その結果、励起光が膜全体に十分に達しなかったり、蛍光の検出が困難であったり、膜の密着性が弱いといった難点があった。

【0008】

【課題を解決するための手段】 上記課題を解決すべく本発明に係る光バイオセンサーは、透明基材上に、金属薄膜、及び分子認識物質の作用によって蛍光、燐光等の発光強度が変化する発光物質を含有する分子認識機能膜をこの順に積層し、この複合材の透明基材側に励起光発生器を配置し、前記分子認識機能膜側に試料溶液の流路を隔てて光検出器を配置した構造として、励起光と検出光との完全分離を行うものである。

【0009】

【作用】 励起光によって薄層金属表面に発生したエバネッセント波、及びこの波によって更に励起された表面プラズモンの作用で、分子認識機能膜中に含まれる発光物質から蛍光又は燐光が発せられる。分子認識機能物質が試料中の特定物質を触媒すると、上記の蛍光等の発光強度が変化するので、この変化を検知して特定物質の濃度を測定する。

【0010】

【実施例】 以下に本発明の実施例を添付図面に基づいて説明する。ここで、図1は本発明に基づく光センサーの第1実施例を示す概要図である。透明基材として高屈折率プリズム7を用い、このプリズムの一面には金属薄膜8を蒸着させている。またこの金属薄膜8には更に分子認識機能物質及び発光物質を含む分子認識機能膜9を電気重合法によって形成し、分析試料液の流れる流路10

(3)

特開平6-27023

3

に直接接して設置している。試料の測定時には、励起光発生器11から発せられた角度分布を持った光を、高屈折率プリズム7によって全反射角以上の角度をもって金属薄膜8へ照射する。このとき金属薄膜8の裏面に図示しないエバネッセント波が発生し、この波及びこの波に励起された表面プラズモンの作用によって発光物質から発光が発生する。この発光を、通路10を隔てて設置した光検出器12によって検知する。光検出器12は、エバネッセント波及び表面プラズモンの両波が直接受光されない程度に離れて設置することにより、分子認識機能膜9から発生した発光や燐光のみを検出することができる。

【0011】上述の光検知機構を更に詳述すると以下の通りである。即ち、励起光が透明基材を透過して全反射角又はそれ以上の角度で金属薄膜8に入射するとき、エバネッセント波が発生してこの金属薄膜8を透過し、分子認識機能膜9及び（場合によっては）分子認識機能膜9に接触している測定物質を含む溶液中に弱い電界分布を形成する。このエバネッセント波による電場が上記発光物質の発光を誘起する。更に、励起光の入射角を調整すると、上記エバネッセント波によって金属薄膜8と分子認識機能膜9との界面に表面プラズモンを励起することができる（「表面プラズモンセンサー」No.112-0 plus E p133）。この表面プラズモンの励起によって、エバネッセント波による電場よりもさらに強い電場が形成され、発光等の発光強度を増大させることが可能である。表面プラズモンを励起させるための入射角度は、温度や誘電体の誘電率等の変動の影響を受けて大きく変化するが、仮にこれらの変動に対応して入射角を変える機能を持つ構成をとった場合、この機器は複雑且つ高価なものになると予想される。従って、本発明では、上記全反射又はそれ以上の角度で、角度分布を持った光、即ち平行光でない光を入射させることが好ましい。

【0012】上記透明基材としては上述のような高屈折率プリズムが好ましく、金属薄膜8は高屈折率プリズムの一面に形成するのが便利である。また金属薄膜8と分子認識機能膜9とを積層した平板を透明基材の1つとして用い、屈折率調整オイルを介して高屈折率プリズムと接するようにすると、分子認識機能膜9の交換が容易に行える利点があるためこの構成も好ましい。上記エバネッセント波は事実上数百nm迄しか及ばないため、金属薄膜8と分子認識機能膜9との合計厚さが余り厚いと、表面プラズモンを励起することができなくなり、発光等の検出も困難になる。従って、本発明に用いられる金属薄膜8と分子認識機能膜9は、エバネッセント波が十分に到達するように極めて薄くする必要がある。金属薄膜8の形成方法としては公知の真空蒸着法、スパッタ法等がある。金属の種類は問わないが、例えば分子認識機能膜9を隣接して形成する関係で、金属表面の親水性、疎水性や、酸化膜の形成され易さ等を考慮する必要があ

10

20

30

40

50

り、また基材との密着性等も考えて選択する必要がある。このような金属としては例えば金、銀が挙げられる。

【0013】分子認識機能膜9には公知の酵素、抗体等のタンパク質を分子認識機能物質として使用することができる。また発光物質としては、公知の蛍光又は燐光を発する物質を使用することができる。発光物質の例を挙げると、フルオレセイン、チオフラビン、エオシン、ローダミンB等がある。励起光の照射は、使用する発光物質の光学特性に合わせた光源を選択する必要がある。これらの発光物質はエバネッセント波及びこれに励起された表面プラズモンによって発光するが、分子認識機能物質が特定物質を触媒した際に、発光強度が低下又は増加する。

【0014】分子認識機能膜9に酵素等を固定するには、上記金属薄膜8を電極として電気的に吸着させる方法、電極の表面を白金黒やパラジウム黒で改質して吸着させる方法、フォトリジストによる方法、電解重合法、ラングミュアープロジェクト（LB）法等が実施されている。上記の電気的に吸着させる方法は、分子認識機能物質に色素で標識する対処法はあるものの、強い電位依存性があるため複数成分を吸着させるには適さない。また上記改質法では吸着の制御が困難となる。更にフォトリジスト法では酵素薄膜の端部の仕上がりが悪くなる。従って本発明では、特に電解重合法又はLB法を用いることが、丈夫な極薄の分子認識機能膜9を形成できるという理由から好ましい。

【0015】上記電解重合法は、分子認識機能膜9の材料となるモノマーの電気化学的酸化又は還元によって重合を開始させ、上記金属薄膜電極表面に強く吸着した形で薄膜を形成する方法である。金属薄膜8は作成する分子認識機能膜9によって陽極、陰極のどちらにも用いることができ、ポテンショスタットによる定電位条件やガルバノスタットによる定電流条件によって成膜される。本発明に係る上記モノマーとしてはピロール、チオフェン、アニリン及びその誘導体等が挙げられる。このモノマー溶液に分子認識機能物質を溶解して共重合させたり、膜内に包括したりすることができる。この電解重合法を採用すると、溶液の酸性度、モノマーの溶解性、電解条件等によって、分子認識機能物質の包括状態、膜の導電性や透過性などに種々の特性を持たせることができる。また、必要な部位だけに膜を形成できること、膜厚を適量で制御できること、電極の形状や大きさに依存しないこと等の有利な特徴がある。

【0016】一方LB法は、分子内に親水性部位と疎水性部位とを有する成膜成分を用いて、気液界面上に形成された単分子膜を固体表面に累積する方法である。この方法には、膜厚の調整を成膜成分分子の長さや累積膜数とで制御できるため超薄膜が形成できること、成膜成分分子を選択することにより分子配列を制御した層状組織

(4)

特開平6-27023

5

体を形成できること、複数の種類の成膜成分を使用して多成分系の膜を形成できること等、形成される薄膜の機能を分子のレベルで設計、制御できるという利点がある。LB法で気液界面状に展開、圧縮した単分子膜を金属薄膜8上に転写する方法には、水平付着法と垂直浸漬法とがあるが、金属薄膜8がプリズムに形成されている場合には水平付着法が望ましい。一方金属薄膜8が透明平板に形成されている場合は垂直浸漬法が適しており、操作も単純化することができる。金属薄膜面はその表面を親水性、疎水性のどちらにすることもでき、疎水性にした場合には、成膜成分分子はその疎水性部位を基板に向けて並び、親水性にした場合にはその親水性部位を基板に向けて並び、

【0017】本発明に係る励起光発生器11としては、例えばハロゲンランプ、水銀ランプ、半導体レーザー、ガスレーザー、LED等が好ましい。また発する光は可視光線、紫外線、赤外線等上記エバネッセント波を生ずるものであればどのようなものでもよい。また本発明に係る光検出器12としては蛍光、燐光の強度を検出できる例えば光電子倍増管、CCD、フォトダイオードのよう

なものがある。【0018】図2は本発明に基づく光センサーの第2実施例を示す概略図である。透明基材として高屈折率プリズム7及び透明基板13を用い、両者の間を屈折率調整オイル14で満たした。この透明基板13の一面には前もって金属薄膜8を蒸着させ、更に分子認識機能物質及び発光物質を含む分子認識機能膜9をLB法によって形成しておいた。次に透明基板13の分子認識機能膜9側が、分析試料液の流れる流路10に直接接するように設置した。試料の測定時には、励起光発生器11から発せられた角度分布を持った光を、高屈折率プリズム7、屈折率調整オイル14及び透明基板13を透過させて全反射角以上の角度をもって金属薄膜8へ照射した。このとき発生した図示しないエバネッセント波及びこの波に励起された表面プラズモンの作用によって、発光物質から蛍光が発生した。この蛍光を、流路10を隔てて設置した光検出器12によって検知した。

【0019】ところで、上記透明ガラス基板13として屈折率 $nd=1.523$ のものを使用し、この上にスパッタ法により金属薄膜8として白金膜を5nmの膜厚で形成した。次にこの金属薄膜8を作用極として電解重合を行った。参照電極に飽和カロメル電極(SCE)を用い、0.8V vs SCEの条件で、分子認識機能物質としてのグルコースオキシダーゼ 200mg/dl、膜材料としてのピロール 0.1M、発光物質としての $[Ru(phen)_3]Cl_2$ 1M、及び緩衝剤としてのKCl 1Mを含む水溶液を、通電量 $25C/cm^2$ で電解し、 $2cm \times 3cm$ の面積に膜厚 $0.1\mu m$ の薄膜を形成した。

【0020】この透明基板13を図2のように配置し、励起光発生器11としてハロゲンランプを用い、入射角

6

約75度で光照射を行った。こうして得られた試料溶液中のグルコース濃度の変化に対する発光量変化を図3に示した。この結果グルコース濃度と発光量とは相関性があることが分った。なおグルコース濃度の高い液ほど反応による酸素消費量が多く、発光量が減少するため、図3縦軸の発光量変化は、グルコース濃度0のときの発光量(最大値)からグルコース濃度が高くなるに連れて減少する発光量を差引いた値を用いたものである。

【0021】更に今度は、屈折率 $nd=1.523$ の透明ガラス基板13上に真空蒸着法により、金属薄膜8としてCr(5nm厚さ)とAu(50nm厚さ)をこの順に積層した。次にこの金属薄膜8上にLB法によってY型2層膜を形成した。成膜成分としては、ジヘキサデシル-N-トリメチルアミノメチルカルボニルグルタマートブロマイド

(dihexamethyl-N-trimethylammoniummethylcarbonylglutamate bromide)に発光物質としてのオクタデシルフルオレッセン(octadecylfluorescein)及び分子認識機能物質としてのペニシリナーゼを加えてクロロホルムを展開液とした。また下水相は、導電率約 $17\mu S/cm$ の純水を用い、表面圧 $25mN/m$ とした。

【0022】この透明基板13を図2のように配置し、励起光発生器11として水銀ランプを用い、入射角約75度で光照射を行った。こうして得られた試料溶液中のペニシリン濃度の変化に対する発光量変化を図4に示した。この結果ペニシリン濃度は発光量と相関性があることが分った。なおペニシリナーゼによってペニシリンがペニシロイック酸に変化するに伴って、水素イオン濃度が高くなり発光量が低下する。従って図4縦軸の発光量変化は、ペニシリン濃度0のときの発光量(最大値)からペニシリン濃度が高くなるに連れて減少する発光量を差引いた値を用いたものである。

【0023】

【発明の効果】以上に説明した如く本発明によれば、励起光の入射側と発生する蛍光等の出射側とは金属薄膜で完全に遮断されているため、励起光と、蛍光等との分離を完全に行い、ノイズのない測定結果を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に基づく光センサーを示す概略図

【図2】同、光センサーを示す概略図

【図3】本発明に基づく光センサーによって測定した、発光量変化-グルコース濃度線図

【図4】同、発光量変化-ペニシリン濃度線図

【図5】従来の光センサーを示す概略図

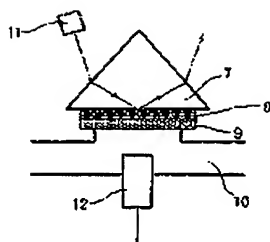
【符号の説明】

1…光ファイバー、2…分子認識機能膜、3…励起光、4…蛍光、5…検出器、6…コア部、7…高屈折率プリズム、8…金属薄膜、9…分子認識機能膜、10…流路、11…励起光発生器、12…光検出器、13…透明基板、14…屈折率調整オイル。

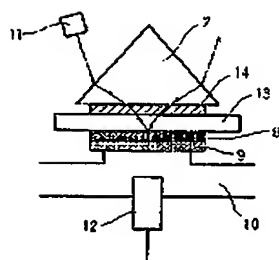
(5)

特開平6-27023

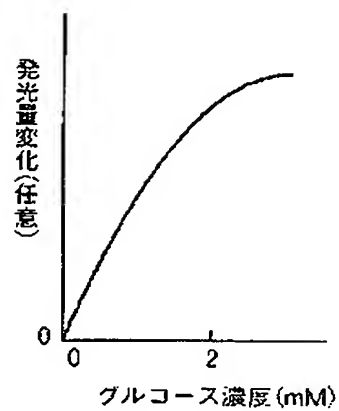
【図1】



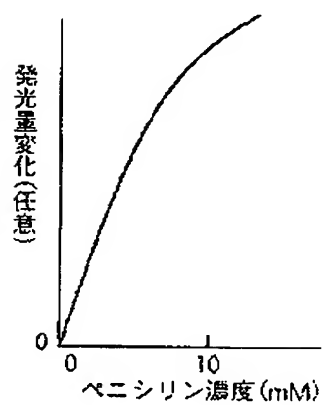
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

